

(Aus der Universitäts-Kinderklinik Basel
[Direktor: Prof. Dr. E. Freudenberg].)

**Quantitative Fermentbestimmungen
im Mekonium nebst Befunden
im Darminhalt bei einer Darmatresie
mit Pankreasfibrose.**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Ernst Schwarz

von Basel



VERLAG VON S. KARGER IN BASEL

Von der Medizinischen Fakultät genehmigt auf Antrag von Prof. *Freudenberg*.

Datum der Promotion: 23. 12. 1952.



Sonderdruck aus «Annales Paediatrici», Vol. 181, Nr. 5.

**Quantitative Fermentbestimmungen
im Mekonium nebst Befunden im Darminhalt
bei einer Darmatresie mit Pankreasfibrose.**

1. Frühere Arbeiten.

Untersuchungen über den Enzymgehalt des Mekoniums gehen bis auf *W. Schild* zurück, der 1895 im Darminhalt Neugeborener unter Benutzung von Gelatine als Substrat proteolytische Wirksamkeit feststellte. Bei ähnlichem experimentellem Vorgehen gelangte fünf Jahre später *Pottevin*, der die ersten Entleerungen Neugeborener als Untersuchungsmaterial benutzte, ebenfalls zum Nachweis eiweißspaltender Enzyme. Durch Mekonium bedingte Proteolyse wurde ferner von *Ed. Müller* und *Ibrahim* 1908 unter Verwendung von Müller-Jochmannschen Serumplatten beobachtet. Es war hauptsächlich letzterer, der seine Untersuchungen bezüglich des Fermentgehaltes im Mekonium auf weitere Substrate systematisch ausdehnte und zusammen mit seinen Schülern *Schoenberger* und *F. Schmidt* außer Proteasen auch fett- und kohlehydratspaltende Wirkstoffe im Kindspech aufzeigte. *Schmidt* gelangte mittels der Fuldsehen Edestin-Methode zum Nachweis proteolytischer Wirksamkeit. Den Nachweis von Enterokinase führten *Ibrahim* sowie *Schoenberger* dadurch, daß sie die Aktivierung von Auszügen des Pankreas frisch geschlachteter Schweine als Testmethode benutzten (*Hekmasche Methode*). *Schoenberger* wies an Hand des Schwindens der Biuret-Reaktion in Peptonlösungen, die mit Mekonium versetzt waren, das *Cohnheimsche* Erepsin nach, während *Schmidt* zur Identifizierung von Dipeptidasen Glycyl-*l*-Tryptophan als Substrat gebrauchte. Das Vorhandensein von Labferment war schon vorher von *Pottevin* und später von *Schmidt* erwiesen worden. Den Nachweis von Trypsin, Kathepsin und Pepsin führte *E. Freudenberg* 1932 in einer einzel-

nen Mekoniumprobe mittels quantitativer Methoden, indem er eine Aktivitätskurve von pH 2 bis pH 9 aufnahm.

Die Anwesenheit einer Lipase im Mekonium wurde verifiziert durch *Ibrahim*, *Kopec* und *Schoenberger*, welche die Methode von *Volhard* und *Stade*, bei der Eigelb als Substrat für die Fettspaltung findet, benützten.

Am zahlreichsten sind die Versuche, stärke- und polysaccharidspaltende Fermente nachzuweisen. Mittels des positiven Ausfalls der Glucosazon-Probe gelang es *Orban* und *Schoenberger*, das Vorhandensein von Lactase sicherzustellen. Letzterer gibt an, auch Diastase, Invertin (Saccharase) und Maltase gefunden zu haben. Von *Schmidt* wurde Diastase mittels der Wohlgemuthschen 24-Stunden-Methode bestimmt. Ferner gelangten durch obige Autoren amylolytische Enzyme zur Bestimmung, wobei der positive Ausfall der Trommerschen Probe bei der Bebrütung wäßriger Stärkelösungen entscheidend war.

Wenn an den besprochenen Untersuchungen Kritik geübt werden darf, dann ist zu bemerken, daß fast durchwegs qualitative Proben und ältere Bestimmungsmethoden zum Enzymnachweis gebraucht wurden. Die Zeiten der Versuche wurden auch häufig enorm lange ausgedehnt.

2. Eigene Untersuchungen.

a) Methodik.

Es handelte sich in weitaus den meisten Fällen um die erste Darmentleerung Neugeborener, die in möglichst frischem Zustand, d. h. innert weniger Stunden zur Verarbeitung gelangte. In einer Reihe von Fällen gelangte auch durch Sektion gewonnener Dünndarminhalt zur Untersuchung. Die Mekoniumproben wurden mit der neun- bzw. vierfachen Menge Glycerin bzw. physiologischer NaCl-Lösung versetzt und gut durchmischt. Nach Überschichtung mit wenig Toluol wurden die den Ansatz enthaltenden Kölbchen mit Gummistopfen verschlossen und vierzehn Tage im Kühlschrank stehen gelassen. Hernach befreiten wir den Ansatz von etwa vorhandenen gröberen Partikeln durch Abnutschen durch eine Sinterglasplatte. Mit diesem so erhaltenen Filtrat wurden nun die einzelnen Versuche zur Bestimmung des Fermentgehaltes durchgeführt.

Labferment.

Eine bekannte Menge Mekoniumfiltrat wurde mit gleichen Volumen n/10 Milchsäure versetzt und einige Zeit in der Kälte belassen. Nach erfolgter Neutralisation der Milchsäure mittels pulverförmigen Calciumcarbonates im Überschuß mit nachfolgender Filtration versetzten wir aliquote Teile dieses Ansatzes und des genuinen Mekoniumfiltrates (ohne Milchsäure-Zusatz) mit roher

Kuhmilch. Die reagierenden Flüssigkeiten waren vorher auf 38° erwärmt worden. Die bei dieser Temperatur bis zum Auftreten der ersten Labung verstreichende Zeit wurde mit der Stoppuhr gemessen und notiert. Auch wurden Parallelversuche durchgeführt, bei welchen Phosphorsäure statt Milchsäure verwendet wurde.

Pepsin, Kathepsin, Trypsin.

Mekoniumfiltrat wurde mit der fünffachen Menge einer 2% alkalischen Caseinlösung versetzt und auf die für das zu untersuchende Enzym optimale Wasserstoffionenkonzentration eingestellt. Für Pepsinbestimmungen benutzten wir pH = 2, für Kathepsin pH = 4, für Trypsin pH = 8. Der so eingestellte Ansatz wurde während vier Stunden bei 39° bebrütet. Nach dieser Frist bestimmten wir nach Trichloressigsäurefällung und Filtrierung den Reststickstoff nach Kjeldahl. Kontrollversuche wurden unter gleichen Kautelen durchgeführt, nachdem das Mekoniumfiltrat bzw. die darin enthaltenen Proteasen durch halbstündiges Kochen im Wasserbad inaktiviert worden waren.

Erepsin.

Nach Einstellung des für Erepsin optimalen pH = 7,8 wurde das Ferment nach zweistündiger Bebrütung bei 39° nach der Titrationsmethode der Aminosäuren von *Waldschmidt-Leitz* in methanolischer Lösung mit alkoholischer Kalilauge quantitativ bestimmt. Als Substrat dienten Glycyl-Glycin oder Glycyl-Tryptophan.

Lipase.

Als Substrate dienten uns Kuhmilch, Olivenöl, Tributyrin und Aethylbutyrat. Die Fermentbestimmung erfolgte nach einer von *Freudenberg* beschriebenen Methode. Dabei wird Kuhmilch mit einigen Tropfen Neutralrot versetzt und mit NaOH bis zum Umschlag nach gelb titriert. Einem Ansatz wird nun 0,5 ccm Mekonium-Glycerin-Filtrat + 20 mg Natriumglykocolat zugegeben. Als Kontrollen dienten Ansätze mit inaktiviertem Mekoniumfiltrat oder ohne dasselbe. Durch Zugabe von wenig Thymol wurde die Sterilität des Ansatzes garantiert. Derselbe wurde im Brutschrank aufbewahrt und während 24 Stunden wiederholt durch Rücktitration mit n/10 NaOH auf seinen Gehalt an freien Fettsäuren geprüft. Weiter gelangten zur Lipasebestimmung die titrimetrische Methode nach *Willstätter* zur Verwendung und das *Volhardsche* Verfahren mit verdünnter Eigelblösung.

Kohlehydratspaltende Fermente.

Zur Diastasebestimmung bedienten wir uns der Methode nach *Wohlgemuth*. Dabei werden mit Mekoniumfiltrat hergestellte Verdünnungsreihen mit einprozentiger Stärkelösung zur Reaktion gebracht. Nach Aufbewahrung im Brutschrank und erfolgter Spaltung werden einige Tropfen n/50 Jodlösung zugefügt. Verdaut sind alle Röhren, die farblos bis violettstichig sind; unverdaute Stärke färbt sich blau.

Lactase, Maltase und Saccharase wurden nach der Methode von *Tauber* und *Kleiner* colorimetrisch bestimmt. Dreiprozentige Zuckerlösung wurde zusammen mit Acetatpuffer von pH = 5 und Enzymlösung während drei Stunden

bebrütet. Nach achtminütigem Kochen mit Barfoed-Reagens und zweiminütigem Abkühlen wird ein molybdänhaltiges Reagens zugegeben und die auftretende Blaufärbung mittels des Pulfrichschen Stufenphotometers durch Messung der Lichtabsorption bestimmt. Zur quantitativen Erfassung wurden die erhaltenen Werte mit denjenigen einer mit dem hydrolysierten Doppelzucker gewonnenen Eichkurve verglichen. Eine solche wurde für jedes der drei Kohlenhydrate aufgenommen.

b) Resultate.

Labferment (Mekonium: Glycerin 1 : 9).

Präparat	Geb.-Gew. g	Geb.-Länge cm	Minuten bis Labung bei 5 cc Milch plus		
			a) 1 ccm Mek., glyc.	b) 0,5 Mek. 0,5 Milchsäure 1 ccm Milchsäure neutralisiert	c) 1 ccm Mek.
1	3900	51,5	16	12	6
2	3850	51	21	17	7
3	2960	48	60	40	32
4	3020	48,5	45	33	16
5	4020	52	27	18	9
6	3400	51	80	49	29
7	3850	50	60	40	29
8	3550	50	40	20	10
9	3600	50,5	15	10	5
10	3670	51	80	53	35
11	3400	51	60	36	22
12	3180	47	85	31	17
13	2950	49	55	21	14
14	2860	48	165	62	34
15	3760	50	28	13	7
16	3070	49,5	50	28	15
17	3130	52	55	28	13
18	3550	50	50	36	15
19	2990	49	190	100	46
20	3300	51	130	90	30
21	2870	48		10	5
22	3700	51,5		48	21
23	3000	49	62	34	17
24	3700	51	68	29	14
25	3680	50	23	12	6
26	2700	47	57	31	16
27	3050	49,5	120	46	26
28	3100	48	120	52	24
29	4180	52	52	25	13
30	4320	53	81	44	24
31	2700	47,5	21	17	9
32	2550	47	50	32	16
33	3530	51	96	75	32
34	3500	48,5	48	32	16

Präparat	Geb.-Gew. g	Geb.-Länge cm	Minuten bis Labung bei 5 cc Milch plus		
			a) 1 ccm Mek., glyc.	b) 0,5 Mek. 0,5 Milchsäure	c) 1 ccm Mek. 1 ccm Milchsäure neutralisiert
35	3100	48,5	20	17	9
36	3520	50	45	40	20
37	2750	47	15	10	5
38	2090	44	130	54	26
39	2750	47,5	120	48	22
40	3520	50	70	40	16
41	3540	50,5	70	40	16
42	3550	50	40	26	13
43	3700	51		11	5
44	3780	50		8	4
45	3250	48,5	40	21	10
46	3000	47	110	45	20
47	3350	49		21	10
48	3410	48,5		28	13
49	3900	52,5		20	9
50	3250	50		21	10
51	3190	50		25	13
52	3310	50		35	16

Ferner gelangten 10 Parallelansätze zur Labung, wobei Mekoniumglycerinfiltrate benutzt wurden, die

aa) ohne Zusätze,

bb) mit n/10 Milchsäure,

cc) mit m/10—H₃PO₄

mit nachfolgender Neutralisation vorbehandelt waren. Hierbei waren die Labzeiten der Reihe bb) durchwegs um ca. ¼ gegenüber aa) verkürzt, während diejenigen der Reihe cc) gleiche Zeiten wie aa) benötigten.

Ergebnis. Im Mekonium ist stets ein «Labferment», d. h. ein milchkoagulierender Effekt nachzuweisen. Dieser Effekt kann durch vorherige Ansäuerung (mit Neutralisierung vor dem Versuch) stark gesteigert werden, eine Möglichkeit, die für andere Labpräparate schon von *Pawlow* beschrieben worden ist. Die Steigerung geht bis zum drei- bis fünffachen Betrag. Der Effekt läßt sich nicht mittels Phosphorsäure nachweisen. Er beruht nach *S. Buchs* darauf, daß der Ansatz mit pH 5,5 in eine günstigere Zone der Labwirkung gebracht wird; denn das Calciumcarbonat bewirkt keine volle Neutralisierung. Das System der Gerinnung wird durch diesen Eingriff, der auch die Calcium-Ionen vermehrt, empfindlicher gemacht.

Proteasen (Mekonium : Glycerin 1 : 9).

Präparat	mg % Rest-N		
	Trypsin	Kathepsin	Pepsin
7	77,3	1,65	0
17	103,6	5,8	0
18	101,1	8,4	0
22	141,9	7,8	3,1
25	136,14	0	0
31	74,1	0	0
41	122	1,0	0
52	73,92	0	0
53	101,92	0	1,0

Ergebnis. Die stärkste Wirkung kommt dem Trypsin zu, während Kathepsin inkonstant in weitem Abstand folgt. Pepsinwirkung bei pH 2 läßt sich nur ausnahmsweise nachweisen. 7 von 9 Versuchen sind negativ! Dies spricht dagegen, daß der oben erwähnte Labeffekt auf Parachymosinwirkung beruht. Es kommt eher das Chymotrypsin in Frage. Eine «Aktivierung» des Pepsins, in der Annahme, daß es als Zymogen vorläge, mittels vorbereitender Behandlung des Mekoniums mit Milchsäure oder Salzsäure ist nicht gelungen.

Dipeptidasen (Glycerinverdünnung des Mekoniums 1 : 4).

Präparat	Geb.-Gew. g	Geb.-Länge cm	Titrierte ccm 0,2 n KOH		0,2 n KOH ccm Zunahme
			Ansatz	Leerwert	
57	3610	49	4,60	2,25	2,35
58	3680	49,5	4,25	2,40	1,85
59	2770	49	4,50	2,20	2,30
60	3660	52	4,00	2,30	1,70
61	2820	46	3,80	2,50	1,30
62	3450	50,5	3,80	2,35	1,45
63	3170	47	4,50	2,55	1,95
64	3600	50	3,80	2,20	1,60
65	2650	47	4,10	2,15	1,95

Bei diesen Versuchen diente als Substrat Glycyl-Glycin; bei einem Versuch wurde auch Glycyl-Tryptophan verwendet:

60	3,50	2,50	1,0
----	------	------	-----

Ergebnis. Dipeptidasen können regelmäßig nachgewiesen werden. Die nur sehr schwach saure Reaktion des Mekoniums zusammen mit seiner Wasserarmut ermöglichen die Konservierung der Dipeptidasen im Dickdarm des Foetus.

Lipasen (Mekonium : Glycerin 1 : 9).

Sowohl nach den Methoden von *Freudenberg* wie von *Willstätter* wurden für die Leerwerte und für die Versuche jeweils gleiche Werte titriert. Einzig bei der *Volhardschen* Methode erhielten wir titrimetrische Unterschiede:

Präparat	Titriert ccm n/10 NaOH								Total nach 72 Std. 38° n/10 NaOH
	für Ansatz u. Leerwert 2Std. 38°		Ansatz Leerwert 18Std. 38°		Ansatz Leerwert 50Std.		Ansatz Leerwert 72Std.		
55	1,5	1,3	3,0	1,3	4,0	2,1	3,9	1,3	5,4
56	1,3	1,4	2,2	1,0	6,3	1,9	7,5	1,3	11,5
17			2,9	1,3	3,0	0,5	2,5	0	6,6

Ergebnis. Nur die *Volhardsche* Methode ermöglicht bei Anwendung langer Zeiten den Nachweis einer Lipase, während die anderen Methoden versagen. Lipasen finden sich im Mekonium also nur spurenweise vor. MilCHFett wird nicht zerlegt, dagegen das Fett des Eidotters.

Kohlehydratspaltende Fermente.

Diastase (Mekonium : Glycerin 1 : 9).

Präparat :	8	17	18	22	25	27	31	41	49	51	52	53	54	55
Stärkespaltung erfolgte bis zur Verdünnung :	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{8}$

Ergebnis. Stärkespaltung war in jedem Versuchsansatz nachweisbar. Die Wirkung ist allerdings recht schwach, was der Erfahrungstatsache entspricht, daß Neugeborene ein nur sehr dürftiges Vermögen zur Stärkespaltung besitzen.

Saccharase, Maltase und Lactase im Dünndarminhalt

(Sektionsmaterial, Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung 1 : 4).

Frühgeburt	g	% - Spaltung von		
		Rohrzucker	Maltose	Milchzucker
1	2000	68,3	51	48
2	1700	63,3	33,3	20
3	830	80	50	10
4	1400	70	—	21,7
	Oesophagusatresie			
5	1200	80	53,3	13,3
6	900	83,3	46,6	11,6

Ergebnis. Alle drei Zuckerarten werden bei paralleler Versuchsanordnung durch Dünndarminhalt prompt gespalten, während alle Versuche mit Mekonium negativ verliefen. Die Intensität der Umsätze vollzieht sich in der Reihe Rohrzucker, Maltose, Milchzucker. Der Lactaseeffekt ist auffällig schwach, besonders bei den kleinsten Frühgeburten unter 1000 g. Dies steht in merkwürdigem Gegensatz zur Tatsache, daß Lactose der physiologische Nahrungszucker des Kindes ist. Offenbar wird auch beim menschlichen Säugling die Lactase adaptiv aus einem schwachen Grundbestand gebildet. *Weinland* hat beim Hund gezeigt, daß bei diesem die Anwesenheit von Lactase abhängig ist von der Fütterung von Milch.

c) Besprechung der Ergebnisse mit Mekonium und Dünndarminhalt.

Wir können unter den geprüften Enzymen drei Gruppen nach ihrer Wirksamkeit im Mekonium bilden. Die Verteilung im Mekonium ist dann folgende:

I gut wirksame	II schwach wirksame	III nur spurenhaf wirksame bis fehlende Enzyme
Labwirkung (nach Aktivierung)	Kathepsin	Pepsin
Trypsin	Lipase (auf Eigelb)	Lipase (auf MilCHFett, Olivenöl, Tributyrin, Aethylbutyrat)
Dipeptidase	Diastase	Saccharase
		Maltase
		Lactase

Die im Mekonium fehlenden drei kohlehydratspaltenden Enzyme sind im Dünndarminhalt totgeborener oder früh verstorbener Säuglinge nachweisbar. Hierbei ist die Reihe nach der Wirkungsstärke Saccharase, Maltase, Lactase. Der Grund für das Verschwinden dieser Enzyme im Mekonium kann nicht im ungünstigen Milieu dort liegen, was eher für Kathepsin und Pepsin gelten könnte, die bekanntermaßen alkaliempfindlich sind. Es ist dagegen denkbar, daß die in das Mekonium übertretenden Carbohydrasen dort oder eventuell schon höher oben durch Proteasen abgebaut und zerstört werden. Auf die relativ schwache Lactase gegenüber der kräftig wirkenden Saccharase wurde bereits hingewiesen. Die physiologisch eher benötigte Lactase steht also im Moment der Geburt nicht in reicher Menge zur Verfügung; sie scheint

sich eher adaptiv zu bilden. Beachtenswert sind auch die geringen Mengen von Lipase im Mekonium. Der Inhalt der oberen Darmteile wurde leider nicht auf Lipase kontrolliert. Möglicherweise liegt auch hier ein Zerstörungsprozeß im Darmkanal wie bei den Carbohydrasen vor. Als Ergebnis der Untersuchungen können wir konstatieren, daß eine gute Ausrüstung für die Eiweißverdauung vorliegt, eine schlechtere für Stärke sowie Fett, während die Disaccharidasen sich ungleich verhalten, indem weniger Lactase als Saccharase und Maltase vorliegt.

3. Enzymbefunde im Darminhalt einer Darmatresie mit Pankreasfibrose ober- und unterhalb der Jejunalatresie.

Wir hatten Gelegenheit, Darminhalt eines am dritten Lebenstage verstorbenen Kindes zu untersuchen, der in mancher Hinsicht wichtige Befunde aufdeckte. Aus der Krankengeschichte fassen wir zusammen:

M. E., geboren am 30. 1. 52, erbricht fäkulent vom ersten Lebenstage an. Operation (Laparatomie) des großen aufgetriebenen Abdomens am 2. 2., wobei 60 cm abwärts vom Pylorus eine vollständige Atresie gefunden wird. Da noch andere Mißbildungen im Bereiche des Darmes und Mesenteriums im oberen Ileum vorliegen, die eine Totalresektion erfordert hätten, wird die Operation abgebrochen. Das Kind stirbt am gleichen Tage. Die Sektion bzw. histologische Untersuchung deckt ferner eine Pankreasfibrose auf. Außerdem bestehen Anomalien bei der Einmündungsstelle des Choledochus im Bereiche der Papille.

Untersucht wurden a) ein Glycerinextrakt des Schwanzteiles des Pankreas, b) Darminhalt oberhalb der Atresie im natürlichen Zustande (sauer reagierend, pH 4,5, sehr reichlich, dünnflüssig), und c) Darminhalt unterhalb der Atresie (eingedickt, fest, so daß mit physiologischer NaCl 1 : 10 verdünnt werden mußte).

a) Untersuchung des Pankreasglycerinextraktes 1:5.

Lipase: 0

Trypsin: 0

Glycyl-Tryptophan: Spaltung noch durch 1:20 verdünntes Pankreasextrakt prompt im Reihenversuch nach Pfeiffer.

Ergebnis. Enzymversuch und anatomischer Befund entsprechen sich, es besteht keine exokrine Funktion. Die Ursache der schwachen Peptidasewirkung bleibt dahingestellt.

b) Untersuchung des Darminhaltes
oberhalb der Atresie (Methodik wie oben).

- aa) Labversuch: auch nach Vorbehandlung mit Milchsäure nach 30 Min. keine Labung
- bb) Zuckerspaltung: Rohrzucker 3,3% Spaltung
Maltose 4,3% Spaltung
Milchzucker 1,0% Spaltung
- cc) Eiweißverdauung: Pepsin 14,1 mg% Rest-N
Kathepsin 9,4 mg% Rest-N
«Trypsin»¹ 9,5 mg% Rest-N

c) Untersuchung des Darminhaltes
unterhalb der Atresie (Methodik wie oben).

- aa) Labversuch: auch nach Vorbehandlung mit Milchsäure nach 90 Min. keine Labung
- bb) Zuckerspaltung: Rohrzucker 62,4% Spaltung
Maltose 30,5% Spaltung
Milchzucker 15,6% Spaltung
- cc) Eiweißverdauung: Pepsin 0 mg% Rest-N
Kathepsin 2,8 mg% Rest-N
«Trypsin»¹ 39,2 mg% Rest-N

Ferner Probe auf Trypsin mittels Verdünnungsreihe, zweistündiger Bebrütung von 0,1prozentiger Caseinlösung bei 37°, und Fällung des unverdauten Caseins mit Essigsäure-Alkohol: Es ergibt sich Verdauung bis zur Verdünnung 1 : 10 240!

Ergebnis. Der Enzymgehalt des stagnierenden, reichlichen Darminhaltes oberhalb der Atresie ist sehr gering. Unterhalb derselben fällt ganz besonders der als «Trypsin» bezeichnete Befund einer Caseinspaltung im alkalischen Bezirk (pH 8) auf. Wir gehen auf diesen Punkt weiter unten ein.

d) Besprechung der Ergebnisse.

Entsprechend dem anatomischen Befund bei der Sektion ergab sich Fehlen von Trypsin und Lipase, während Glycyl-Tryptophan vom Pankreasextrakt etwas gespalten wurde. Der Darminhalt des Teiles oberhalb der Atresiestelle ließ den Labeffekt vermissen, zeigte schwache Pepsinwirkung und eine ganz geringe Kathepsin- und Trypsinwirkung. Der untere Teil ließ ebenfalls die Labung vermissen, ergab aber kräftige Spaltung der Disaccha-

¹ Leider stand uns im Augenblick der Durchführung dieser Versuche ein spezifischer Trypsin-Inhibitor nicht zur Verfügung.

ride in der aufsteigenden Reihe Milchzucker, Maltose und Rohrzucker. Im Abschnitt unterhalb der Atresie fehlte Pepsin, lag ein sehr schwacher Kathepsineffekt vor, aber eine deutliche Caseinspaltung bei alkalischer Reaktion. Dieser Befund wurde durch zwei voneinander unabhängige Methoden bestätigt. Er steht im Widerspruch zu den zur Zeit vorherrschenden verdauungsphysiologischen Meinungen betr. einer Darmverdauung von Casein in alkalischem Milieu.

Bei der Entdeckung des Erepsins (1901) hat *O. Cohnheim* diesem bekanntlich neben seinen peptolytischen Wirkungen eine relativ schwache Wirkung auf Casein und Histone zugeschrieben. Da Erepsin im Darmsekret und im Darmschleimhautextrakt der Säugetiere und später aller Wirbeltiere gefunden wurde, so mußte dem Darm, enzymologisch beurteilt, auch eine trypsinähnliche Wirkung zugesprochen werden, wenn diese Ansicht richtig war. Die *Willstättersche* Schule vermißte aber in Darmextrakten diesen Effekt. Endgültig entschieden schien die Frage zu sein, als *E. und J. Waldschmidt-Leitz* (1927) im Sekret von Vellaschlingen beim Hunde keinerlei Trypsinwirkung fanden. Betrachtet man freilich diese Versuche genauer, so steigen ernstliche Bedenken gegen sie auf. Es wurde nicht etwa wirkliches Sekret untersucht, sondern man spülte die Darmschlinge mit Kochsalz- und Bikarbonatlösungen aus. Die zurückfließende Flüssigkeit, die an Volumen abgenommen hatte (!), wurde als Sekret bezeichnet und verarbeitet. Wenn hierbei in wenigen ccm noch eine gute Erepsinwirkung nachzuweisen war, so zeigt dies, daß der Darm viel mehr Erepsin als Proteasen bildet. Da die Flüssigkeiten aber vermutlich nur ganz wenige Prozent Sekret enthalten haben können, so ist der Schluß auf das Fehlen von «Trypsin», d. h. von im alkalischen Bereich wirksamen Proteasen als unstatthaft zu bezeichnen. So nimmt es nicht wunder, daß andere Autoren bei anderem Vorgehen trypsinartige Wirkungen in isolierten Darmschlingen gefunden haben. Verzichtet man auf ältere Versuche, bei denen die Berücksichtigung des pH vielleicht zeitbedingt noch mangelhaft war (*F. Kutscher* und *J. Seemann*, 1902), so liegt aus neuerer Zeit eine Beobachtung aus dem Physiologisch-chemischen Institut in Zürich vor, die die alte Auffassung *O. Cohnheims* voll bestätigt. *E. Frey* vermochte mittels einer Substratschwundmethode durch Saft aus einer menschlichen Fistel, die sich wie eine Thiry-Vella-Fistel auswirkte, Edestin im Bereiche von pH 3,4 bis zu pH 8,6 abzubauen. Dieser Fistelsaft war fast frei von Leukocyten,

enthielt natürlich aber einige Bakterien. Das Optimum lag bei pH 8,1. Der Verfasser nimmt an, daß ein trypsinartiges Enzym vorlag. Unsere Beobachtung bestätigt wieder diese Feststellung und zeigt zugleich, da oberhalb sowohl eine Atresie wie auch eine Pankreassklerose vorlag, daß diese «tryptische» Caseinolyse nicht vom Pankreas herrührt.

Eine weitere Angabe über Proteolyse durch gewaschene und dann abgeschabte Darmschleimhaut des oberen Dünndarms, welche mit $\frac{1}{2}$ ihres Volumens 2% Essigsäure, wenig Chloroform und Toluol 24 Std. bei 37° aufbewahrt worden war, finden wir bei S. G. Hedin (1923). Das Filtrat hiervon wurde drei Tage lang gegen Leitungswasser dialysiert und diente als Enzymlösung. 10 ccm derselben vermochten von 25 ccm 4% Caseinlösung in drei Tagen bei 37° erheblich mehr Stickstoff freizusetzen, als in der erhitzten Enzymlösung gebildet wurde, und zwar mit einem Maximum bei pH 9! Es ist freilich hierzu zu sagen, daß die Versuchszeit mit drei Tagen sehr lange bemessen war. Die Eiweißfällung geschah durch Gerbsäurelösung. Aus dem Fehlen einer Hemmung der Caseinolyse durch Serumalbumin schließt Hedin, daß kein Trypsin vorgelegen haben kann.

Pierce, Nasset und Murlin haben 1935 operativ aus vorgelagerten Darmschlingen des Jejunums von Hunden Jejunalsaft gesammelt. 1 ccm hiervon konnte eine 2%ige Casein- oder Albuminlösung bei pH 7,6 nicht spalten. Nach Zufügen von Galle und etwas Gelatine konnte jedoch bei der Formoltitration ein Abbau der Gelatine festgestellt werden. Die Autoren schließen auf das Vorhandensein eines gelatinespaltenden Enzyms im Darmsaft bei pH 7,6. Auch hier waren die Versuchszeiten mit 6, 12, 24 und 48 Std. recht lang.

Wenn die Möglichkeit einer Proteolyse durch Darmsaft gegenüber Edestin, Casein und Gelatine hierdurch erwiesen ist, so bestätigt unsere Beobachtung die genannten Autoren. Eine andere Frage ist die der physiologischen Bedeutung einer solchen Protease. Da das von uns gebrauchte Material aus pathologischen Verhältnissen stammt und sich bei einer Darmatresie im Darm anhäufen mußte, so kann man es nicht mit einem natürlichen Sekret vergleichen. In verdauungsphysiologischer Hinsicht wird die Eiweißspaltung durch Darmsekret als sehr niedrig anzusehen sein. Grundsätzlich ist sie aber möglich. Dies muß im Gegensatz zu Waldschmidt-Leitz ausdrücklich betont werden.

Zusammenfassung.

1. Mittels quantitativer Methoden wurde das Mekonium Neugeborener (erste Entleerung) auf den Gehalt einer Reihe von Enzymen untersucht. Es fanden sich: ein Labeffekt (nach geeigneter Aktivierung), kräftige Trypsin- und schwache Kathepsinwirkung, Pepsin nur schwach und ausnahmsweise. Dipeptidasen waren regelmäßig vorhanden.

2. Lipase kann nur bei protrahierter Wirkung mit der Eigelbmethode *Volhards* nachgewiesen werden, ist also nur spurenhaft vorhanden.

3. Die diastatische Kraft ist ebenfalls ziemlich schwach. Saccharase, Maltase und Lactase fehlen im Mekonium, sind aber im Dünndarminhalt (Sektionsmaterial) in der angeführten Reihenfolge der Wirkungsstärke vorhanden. Es wird angenommen, daß Lactase von einem Grundbestand im Foetusdarm ausgehend post partum adaptiv gebildet wird.

4. Es wurde auch das Pankreas und der Darminhalt ober- und unterhalb einer Atresiestelle eines Kindes untersucht, welches an Pankreasfibrose mit Darmatresie gelitten hatte. Entsprechend dem anatomischen Befund konnte mit dem Pankreasextrakt keine Trypsin- und Lipasewirkung erzielt werden, während Glycyl-Tryptophan durch diesen Extrakt schwach gespalten wurde. Der Darminhalt oberhalb der Atresiestelle zeigte nur ganz unbedeutende Fermentwirkungen, während im Abschnitt unterhalb der Atresie neben fehlender Lab- und Pepsinwirkung und sehr schwachem Kathepsineffekt eine kräftige Spaltung der Disaccharide in der aufsteigenden Reihe Milchzucker, Maltose, Saccharose und eine deutliche Caseinspaltung in alkalischem Milieu nachgewiesen werden konnten.

5. Der letztgenannte Nachweis bestätigt die Beobachtung von *E. Frey*, nach der der Darm zur Proteolyse in dem weiten pH-Bereich von 3 bis 8 befähigt ist, was an einem Fistelträger festgestellt wurde. Die Darmtryptase ist freilich in sehr viel geringeren Mengen vorhanden als das Pankreastrypsin im Pankreas.

Summary.

The first meconium evacuation in new-born children was examined with quantitative methods for a number of enzymes. Further the effects of pancreas and intestinal ferments were determined in a child who had died at the age of 3 days from pancreas

fibrosis and atresia of the ileum. The test was carried out with material obtained above and below the atresia, which was about 60 cm. below the pylorus. The most striking finding was disaccharid splitting and marked casein splitting in the alkaline medium distally from the atresia effected by the bowel contents. This confirms *Frey's* observation and is according with *O. Cohnheim's* statement that the intestine can proteolyse within the wide range of pH 3-8.

Résumé.

La première portion du méconium de nouveau-nés a été examinée quant à sa teneur en une série d'enzymes. Chez un nouveau-né, atteint d'atrésie intestinale et de fibrose du pancréas, et décédé au troisième jour, l'activité enzymatique du pancréas et du contenu intestinal au-dessus et au-dessous de l'atrésie a été déterminée. La constatation étonnante fut faite que le contenu intestinal au-dessous de l'atrésie, qui se trouvait elle-même à 60 cm. du pylore, contient des ferments hydrolysant les disaccharides et aussi, dans une forte mesure, la caséine en milieu alcalin. Cela confirme l'observation de *E. Frey* chez un porteur de fistule et l'ancienne conception de *O. Cohnheim*, selon laquelle l'intestin lui-même est capable de protéolyse dans un large domaine allant de pH 3 à pH 8.

Literatur.

Buchs, S.: Die Biologie des Magenkathepsins, S. Karger AG., Basel 1947. — *Cohnheim, O.*: Z. physiol. Ch. 33, 451, 1901. — *Freudenberg, E.*: Klin. Wschr. 11, 1932. — *Frey, E.*: Diss., Zürich 1936. — *Fromme, A.*: Hofmeisters Beitr. 7, 51. — *Hecht, Wien. Klin. Wschr.* 45, 1908. — *Hedin, S. G.*: Z. physiol. Chem. 125, 289, 1923; 130, 45, 1923. — *Hekma, E.*: Arch. Physiol. 343, 1904. — *Ibrahim, J.*: Verh. d. 80. Vers. dtsch. Naturf. u. Ärzte, Köln, 2, 309, 1908; Verh. d. Gesellschaft f. Kinderheilkde. 21, 1908; Biochem. Z. 22, 24, 1909. — *Kutscher, F.*, und *J. Seemann*: Z. physiol. Chem. 35, 432, 1902. — *Langendorff, O.*: Arch. Anat. u. Physiol. 95, 1879. — *Müller, Ed.*: Dtsch. Arch. klin. Med. 92, 209, 1908. — *Orban, R.*: Prag. med. Wschr. 427, 1899. — *Pierce, H. B.*, *E. S. Nasset* and *J. R. Murlin*: J. biol. Chem. 108, 239, 1935. — *Pottevin, H.*: C. R. Soc. Biol. 589, 1900. — *Raubitschek, E.*: Z. exper. Path. u. Ther. 4, 1907. — *Schild, W.*: Z. Hyg. u. Inf.-Krankh. 19, 118, 1895. — *Schmidt, R.*: Biochem. Z. 63, 287, 1914. — *Schoenberger, R.*: Über Mekoniumfermente. Diss., München 1909. — *Stade, W.*: Hofmeisters Beitr. 3, 291. — *Tauber, H.*, and *J. S. Kleiner*: J. Biol. Chem. 1, 249, 1932. — *Waldschmidt-Leitz* und *Harteneck*: Z. physiol. Chem. 147, 303 u. 149, 214, 1925. — *Waldschmidt, Leitz* und *Schäffner*: Z. physiol. Chem. 151, 31, 1925/26. — *Willstätter, R.*, *Waldschmidt-Leitz* und *Memmen*: Z. physiol. Chem. 125, 93, 1922. — *Weinland*: Z. Biol. 38, 607, 1899. — *Zweifel*: Untersuchungen über den Verdauungsapparat der Neugeborenen, Berlin 1874.

